BESTIMMUNG DES DNS-GEHALTES DER EINZELNEN CHROMOSOMEN DES MÄNNLICHEN KARYOTYPS BEIM MENSCHEN DURCH FLUORESZENZ-CYTOPHOTOMETRIE

Heinz Reiniger

1972

Aus der Kinderpoliklinik der Universität München
Direktor : Prof. Dr. H. Spiess

Bestimmung des DNS-Gehaltes der einzelnen Chromosomen des männlichen Karyotyps beim Menschen durch Fluoreszenz-Cytophotometrie

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Heinz Reiniger
aus Marienbad

München 1972

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter	:	Priv.Doz.Dr.med.J.-D.Murken
Mitberichterstatter	:	Professor Dr.med.H.Spiess
Dekan	:	Professor Dr.med.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung : 19.12.1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSÜBERSICHT

I. Einleitung 1

II. Literaturübersicht 3

III. Eigene Untersuchungen

1. Material 6

2. Methode der Chromosomenpräparation 6

3. Auswahl der Mitosen 7

4. Färbung der Chromosomen 7

5. Meßinstrument 10

6. Meßvorgang

6.1 Einstellen des Objekts im Phasenkontrast 10

6.2 Weg des Anregungslichtes 15

6.3 Weg des Fluoreszenzlichtes 18

6.4 Eichung der Photokathode 20

6.5 Einstellung der Blenden und Meßvorgang 21

7. Ergebnisse

7.1 Vorversuche 24

7.2 Abfall der Fluoreszenzintensität 27

7.3 Verhältnis zwischen Fluoreszenzintensität und Farbstoffkonzentration 27

7.4 Meßergebnisse 30

IV. Diskussion

1. Das Problem der relativen Fehlerhaftigkeit fluorometrischer Messungen 35

2. Präparative Schwierigkeiten und Fehler 36

3. Reabsorption 37

4. Kritische Prüfung der Ergebnisse 38

V. Zusammenfassung 40

VI. Literaturverzeichnis 42

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546011_0072

I. EINLEITUNG

Chromosomen sind die wichtigen Kontrollzentren des Zellstoffwechsels, welche die Variationsbreite innerhalb einer Spezies bestimmen und außerdem die einzige Grundlage für die Variation zwischen den Spezies darstellt. Beim Menschen richtet sich das Interesse abgesehen von den vielen grundsätzlichen Fragen, z.B. nach dem Verhältnis zwischen Struktur der Chromosomen und der Funktion ihrer Grundeinheit, der DNS, vor allem auf die vielen klinischen Fragen, wie exogene Schädigung des genetischen Materials oder die Cancerogenese. Deshalb ist die Kenntnis des DNS-Gehaltes individueller Chromosomen von großer Bedeutung für vergleichende Untersuchungen, zur Identifizierung von Chromosomen sowie für die Feststellung von Materialverlust oder Materialvermehrung bei einzelnen Chromosomen.

Die herkömmlichen morphologischen Methoden, wie die Bestimmung der Länge der Chromosomen, die Feststellung der Centromerposition und der Satelliten, sowie die Autoradiographie erweisen sich der direkten Bestimmung des DNS-Gehaltes unterlegen (17). Da man mit der Messung des DNS-Gehaltes einen direkten Bezug zum Träger der genetischen Information gewinnt, ist diese Methode aufschlußreicher und genauer als Längenmessungen (29); außerdem ist sie unabhängig vom Kontraktionszustand der Chromosomen und von der Ausbreitung ihrer Arme.

Da einerseits zur Bestimmung des DNS-Gehaltes von Chromosomen verschiedene, meist recht aufwendige Verfahren veröffentlicht wurden (1, 4, 7, 16, 23, 28, 29) und andererseits fluorometrische Methoden zur Messung des DNS-Gehaltes an Zellkernen sehr gute und genaue Ergebnisse erbrachten, lag es nahe fluorometrische DNS-Messung auch an Chromosomen zu versuchen (18).

Mit den Farbstoffen Auramin OO (25), Acridin-Orange (2), Acriflavin (2), Coriphosphin O (2) und Pararosanilin (21) stehen erprobte DNS-spezifische Fluorochrome zur Verfügung. Fluorometrische Verfahren sind frei von den Schwierigkeiten der Absorptionsmethode und so ist es zum Beispiel nicht notwendig die Unregelmäßigkeit der Substanzverteilung im Chromosom durch eine Messung der Objektfläche zu berücksichtigen. Dafür müssen Probleme wie Fluoreszenzabfall, Reabsorption und teilweise Nicht-Linearität zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration des Fluorochroms beachtet werden.
Diese Arbeit berichtet über die Bestimmung des DNS-Gehaltes der einzelnen Chromosomen im männlichen Karyotyp des Menschen mit Hilfe einer quantitativen fluorometrischen Methode.

II. Literaturübersicht

Bis heute liegen nur wenige Berichte über quantitative cytochemische DNS-Messungen an Chromosomen vor. Es handelt sich dabei um eine Reihe verschiedener Methoden, die aber fast alle den Nachteil haben ungeheuer aufwendig zu sein.

RUDKIN und SCHULZ (28) bestimmten den relativen DNS-Gehalt einzelner Chromosomen von DROSOPHILA MELANOGASTER densitometrisch durch Abtasten eines mit UV-Licht aufgenommenen Negatives.

Die ersten DNS-Messungen an Säugetier-Chromosomen nahmen CARLSON, CASPERSSON et al. 1963 vor (4). Mit Hilfe direkter Mikrospektrophotometrie nach FEULGEN-Färbung bestimmten sie den DNS-Gehalt der 22 Chromosomen des chinesischen Hamsters.

RUDKIN et al. (29) veröffentlichten dann 1965 ihre densitometrisch DNS-Messungen an 5 menschlichen Metaphasen. Dabei lag der Variationskoeffizient für die einfach zu identifizierenden Chromosomen 1, 2, 3 und das von ihnen genauer untersuchte Philadelphia Chromosom unter 10 %, während er für den gesamten Kariotyp zwischen 6 und 18 % schwankte. Interessanterweise war die Variabilität für die Position des Centromers, also dem Verhältnis von langem Arm zum ganzen Chromosom dabei nur halb so groß wie die für das ganze Chromosom.

RADLEY (23) berichtete über absorptionscytophotometrische FEULGEN-DNS-Messungen an 5 Metaphasen des Sumpfwallabi PROTEMNODON BICOLOR.

MEDELSON et al. (16) benutzten ein sogenanntes CYDAC-System, bestehend aus einem Flying-Spot-Mikroskop in Verbindung mit einem Computer, das den Strahl einer Kathode zum Abtasten des Chromosoms verwendet. Weil sich die FEULGEN-Färbung für diese Methode als zu kontrastarm erwies, unterzogen sie die Chromosomen

aus 3 menschlichen Metaphasen einer Ribonuklease-Behandlung und färbten sie mit Gallocyanin-Chromalaun. Der Variationskoeffizient liegt bei dieser Methode für das ganze Chromosom zwischen 5 und 15 %.
Mit Hilfe von FEULGEN-Absorptions- und UV-Absorptionsmessungen untersuchte BAILLY (1) den DNS-Gehalt von acht Chromosomenpaaren des Wassermolches PLEURODELES WALTLII MICHAH. Dabei ergab sich für die UV-Methode eine größere Genauigkeit.
GAILLARD et al. (7) benutzten 1968 eine photographisch-photometrische Methode (photographic colorimetrie) zur Messung des DNS-Gehaltes menschlicher Chromosomen. Dabei stellten sie fest, daß die Methanol-Eisessig-Fixierung zu DNS-Verlusten in Höhe von 10 - 20 % führt, was durch die von ihnen entwickelte Sedimentationstechnik (7) weitgehend vermieden wird. Die Reproduzierbarkeit ihrer Werte ist mit 2 - 6 % sehr gut und ihr Variationskoeffizient liegt bei 9 %. Außerdem fanden sie eine umgekehrte Proportionalität zwischen DNS-Gehalt und Variationskoeffizient. Bei vergleichenden Messungen von DNS-Gehalt und Chromosomenlängenmessungen erwiesen sich die DNS- den Längenmessungen überlegen.

In der Folgezeit wurden die genannten Methoden von einigen Autoren auf Chromosomen anderer Spezies angewandt, wobei die Ergebnisse der Vorgänger zum größten Teil bestätigt werden konnten.

NITSCH et al. (18) beschrieben 1970 eine neue Methode zur Bestimmung relativer DNS-Mengen einzelner Chromosomen. Mit Hilfe eines Mikroskopphotometers bestimmten sie die im sichtbaren Bereich gelegene Fluoreszenz der FEULGEN-gefärbten DNS. Am Beispiel der 24 Chromosomen des chinesischen Hamsters zeigten sie, daß man mit dieser Methode verhältnismäßig einfach den relativen

DNS-Gehalt einzelner Chromosomen messen kann, wobei der Variationskoeffizient nur zwischen 4 und 11 % schwankte. Auch GREIPL (11) konnte die Brauchbarkeit dieser Methode nachweisen.

Da ausführliche Ergebnisse von fluorometrischen DNS-Messungen an Zellkernen vorliegen, lag es nach der Arbeit von NITSCH et al. nahe zu versuchen, den DNS-Gehalt menschlicher Chromosomen quantitativ fluorometrisch zu bestimmen.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

1. Material

Die Mitosen wurden aus Blutkulturen männlicher, zum Zeitpunkt der Untersuchungen gesunder Probanden gewonnen.

2. Methode der Chromosomenpräparation

1. Mit einer sterilen, heparinisierten Pipette werden möglichst ohne Ansaugen pro Kultur 0,2 ml Kapillarblut abgenommen und in ca. 5 ccm einer Nährlösung geblasen (GIBCO Chromosomenmedium 1 A). Dann wird die Kultur für 65 - 72 Stunden bei 36° C inkubiert.
2. Drei Stunden vor dem Ende der Inkubation gibt man 0,03 mg Colcemid® zu (entsprechend einer Endkonzentration von $6 \cdot 10^{-6}$ g/ml Medium).
3. Nach der Inkubation werden die Zellen suspendiert bei 800 Upm 5 min lang zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt.
4. Zur hypotonen Quellung gibt man zum Zellpfropf ca. 2 ml Aqua dest. und läßt dieses ungefähr 5 min einwirken. Anschließend abermaliges Zentrifugieren und Absaugen.
5. Mit 3 ml Fixativ (Methanol-Eisessig-Gemisch 3:1) wird die Zellkultur mindestens 5 min behandelt. Die Einwirkungszeit des Fixativs kann dabei weitgehend variiren.
6. Zum Schluß wird nochmals abgesaugt. Nun läßt man mindestens 6 Tropfen der Zellsuspension aus der Pasteurpipette auf einen Objektträger fallen und trocknet sie über der Bunsenbrennerflamme.

3. Auswahl der Mitosen

Im Phasenkontrastmikroskop wurden die ungefärbten, nicht eingedeckten Präparate dann auf brauchbare Mitosen durchgemustert und sofort zur späteren Identifizierung photographiert (Abb. 1). Für die Wahl einer Mitose galten folgende Kriterien :

1. Die numerische Vollständigkeit der Mitose
2. Die gute Erkennbarkeit der Einzelchromosomen
3. Die gestreckte Lage der Chromosomen bei guter Spreitung ihrer Arme
4. Jedes Chromosom mußte von dem Nächstliegenden mindestens 3 µ entfernt liegen (das entspricht ungefähr der Länge eines G-Chromosoms in der Mitose.)

Diese Auswahlkriterien genügte nur sehr selten eine Mitose.

4. Färbung der Chromosomen

1. Fixation der ausgesuchten Präparate in Formaldehyd-Methanol (1 : 9) für 3 min.
2. 20 sec waschen in Methanol
3. Hydrolyse in 4n-HCl bei 28°C für 105 min. (BÖHM(2)
4. Stoppen der Hydrolyse in 1n HCl für 1 min.
5. Färben in 0,1 % frisch bereitetem Pararosanilin für 60 min. (nach GRAUMANN (10) und NITSCH (18) statt 0,5 % beziehungsweise 0,01 %)
6. Dreimaliges Spülen für je 1 min in frischer Bisulfit-Lösung (5 ml 10 %iges Natrium-Metabisulfit, 6 ml 1n HCl, ad 100 ml Aqua dest.).
7. 10 min in fließendem Leitungswasser waschen.
8. Je 2 min in 70 % und 90 %igem Alkohol entwässern und 2 min in ein Gemisch aus absolutem Alkohol und Xylol (1 : 1) tauchen.

Abb. 1 Metaphaseplatte eines männlichen Probanden im Phasenkontrast

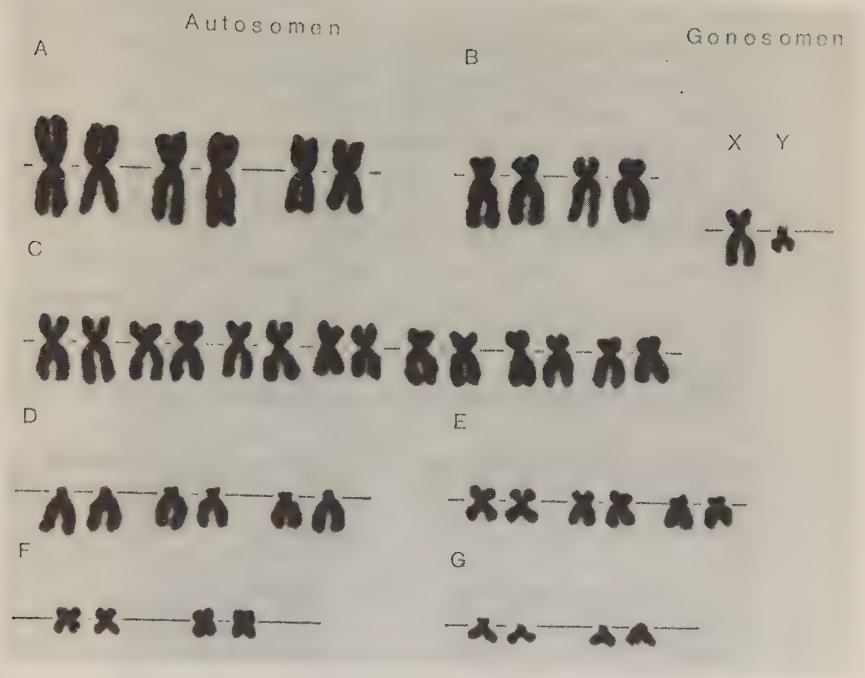


Abb. 2 Normaler Karyotyp des Mannes

9. Dreimal je 5 min in Xylol tauchen.
10. Eindecken mit Eukitt.

Die Präparate wurden dann bis zur Messung im Dunkeln aufbewahrt um ein Ausbleichen zu verhindern.

In Vorversuchen wurden Präparate mit anderen Pararosanilinkonzentrationen (0,5 %, 0,05 %) gefärbt und verschiedene andere Einbettungsmedien benutzt (dickflüssiges und dünnflüssiges Paraffinöl sowie mit nichtfluoreszierenden Cargille-Öl, und Cedak).

5. Meßinstrument

Die Messungen wurden mit dem MPV (Mikroskopphotometer mit variabler Meßblende, E. Leitz, Wetzlar) durchgeführt (Abb. 3) (33), das mit einer Einrichtung versehen ist, die gleichzeitige und sukzessive Durchlicht-Phasenkontrastbeobachtung und Auflicht-Fluoreszenzanregung erlaubt (10). Die Fluoreszenzanregung mit Auflicht besitzt gegenüber der Anregung mit Durchlicht den Vorteil, daß das Objekt zusätzlich als Kondensor fungiert und damit die auf das Präparat fokussierte Lichtmenge bei der Verwendung von Objektiven mit höherer numerischer Apertur exponential ansteigt.

6. Meßvorgang

6.1 Einstellen des Objekts im Phasenkontrast

Das Einstellen des Chromosoms erfolgt im Phasenkontrast (38) um ein Ausbleichen zu verhindern. Zur Verwendung kam dabei das Objektiv Phaco NPL Ö1 100/1.30 (7 in Abb.4), ein Phasenkontrast-Kondensor (5 in Abb. 4) und eine Wolfram-Niedervoltlampe (1 in Abb. 4).

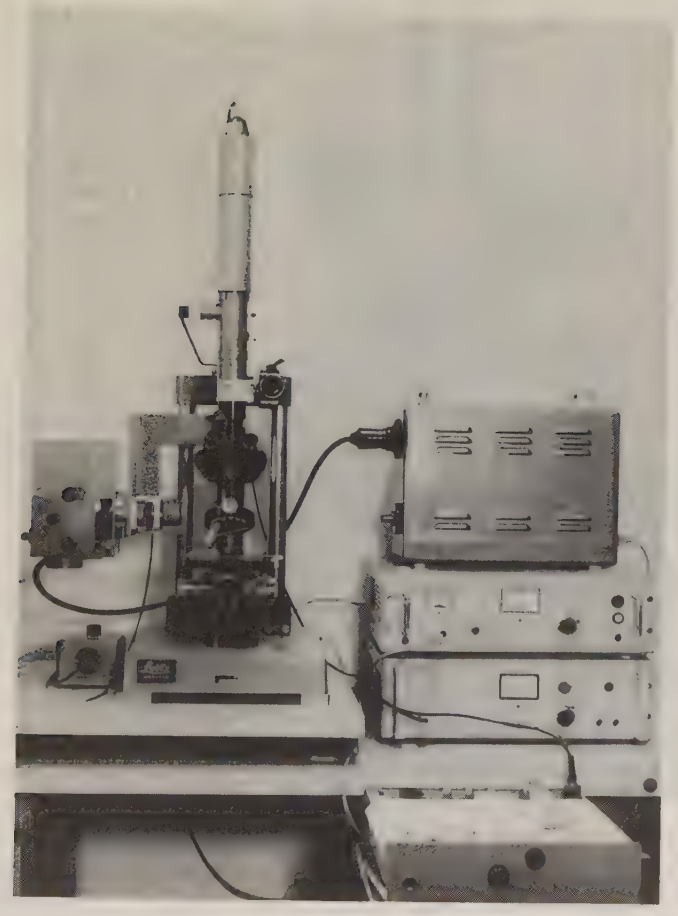
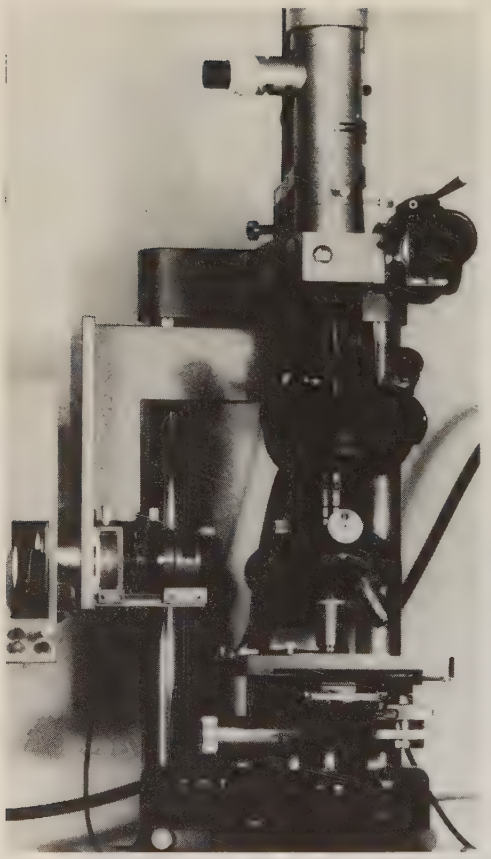


Abb. 3 Gesamtübersicht über das verwendete MPV



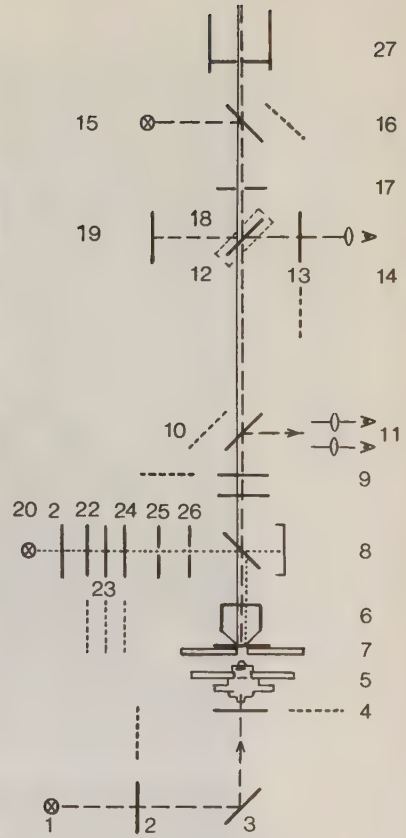


Abb. 4 Photo und parallel dazu die schematische Darstellung des Strahlenganges im MPV

1 Wolfram-Niedervolt-Lampe
2 Filter OG 570
3 Umlenkspiegel
4 Verschluß
5 Phasenkontrastkondensor
6 Objektiv
7 Objekt
8 dichromatischer Teilerspiegel mit eingebautem Sperrfilter u. Lichtfalle
9 auswechselbares Sperrfilter
10 ausklappbares Umlank-Prisma
11 binokularer Tubus
12 Spiegel, mit Teilerspiegel (18) auswechselbar
13 Verschluß
14 Photometereinblick
15 Meßblendenbeleuchtung
16 ausklappbarer Spiegel
17 Meßblende
18 halbdurchlässiger Teilerspiegel, mit Spiegel (12) auswechselbar
19 Tripel-Spiegel
20 Xenon-Hochspannungslampe
21 Wärmeschutzfilter
22 Rot-Dämpfunsfilter BG 38
23 Anregungsfilter
24 Compur-Photoverschluß
25 Leuchtfeldblende
26 Steulichtblende
27 Photokathode mit Photovervielfacher

Ein 2 mm OG Filter (SCHOTT u. Gen.) (2 in Abb. 4) beschränkt das Licht auf den roten Bereich der auch vom Sperrfilter durchgelassen wird. Der Lichtstrahl durchläuft dann einen der 4 dichromatischen Teilerspiegel und das zugehörige, eingebaute Sperrfilter (8 in Abb. 4) aus denen der neuen Fluoreszenz-Illuminators nach Ploem besteht, passiert das auswechselbare Sperrfilter (9 in Abb. 4) und wird von dem ausklappbaren Umlenkprisma (10 in Abb. 4) in den binokularen Beobachtunstubus (11 in Abb. 4) (Periplan-Okular 10X) reflektiert. Klappt man dieses Prisma aus, so geht der Lichtstrahl zu einem zweiten Spiegel (12 in Abb. 4) und wird in den Photometereinblick reflektiert (14 in Abb. 4). Dieser zweite Spiegel kann auch durch einen halbdurchlässigen Teilerspiegel (18 in Abb. 4) ersetzt werden, der nur 50 % des Lichtes in den Photometereinblick reflektiert, während die restlichen 50 % die durchgelassen werden, die Meßblende (17 in Abb. 4) passieren und auf die Photokathode (18 in Abb. 4) treffen, wenn der Spiegel (16 in Abb. 4) ausgeklappt ist. Über diesen letzten Spiegel wird das Licht der Niedervoltlampe (15 in Abb. 4) von oben auf die Meßblende (17 in Abb. 4) umgelenkt, die dann im Photometereinblick (14 in Abb. 4) als helles Bild sichtbar wird. Unterhalb der Meßblende wird dabei das Licht vom Teilerspiegel (18 in Abb. 4) zum Tripelspiegel (19 in Abb. 4) umgelenkt, von diesem reflektiert und kann nun den Teilerspiegel in Richtung auf den Photometereinblick hin passieren. So kann man die Meßblende an das in der Lupe sichtbare Objekt angleichen. Um die großen Chromosomen, die mit Vierkantblenden ausgeblendet werden, in jeder Lage im Präparat exakt in die Meßfeldblende einstellen zu können, wird die Verschraubung des Oberteiles des Photometers mit der Blende so weit gelöst, bis es sich axial drehen läßt. Dies kann man auf Grund der

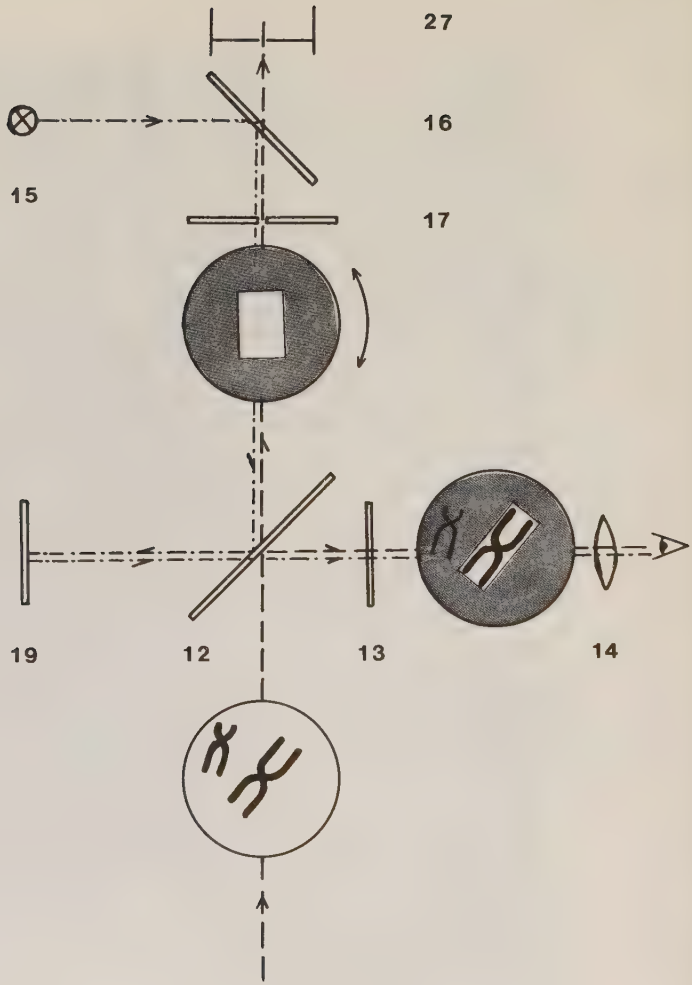


Abb. 5 Angleichen der Meßfeldblende an das Chromosom im Phasenkontrast (Die Zahlen entsprechen denen in der Erklärung des Strahlenganges auf Seite 12).

Bauweise des Gerätes ohne Bedenken tun und außerdem anhand des Fadenkreuzes im Photometereinblick (14 in Abb. 4) gut kontrollieren.

6.2 Weg des Anregungslichtes

Bei der Anregung zur Fluoreszenz werden die Verschlüsse (4 und 13 in Abb. 4) geschlossen und der Spiegel (16 in Abb. 4) ausgeklappt. Durch Öffnen des Verschlusses (24 in Abb. 4) passiert das von der 150 W Xenonlampe (Osram, Berlin) kommende Anregungslicht ein Wärmeschutzfilter (21 in Abb. 4), ein 5 mm dickes Rotdämpfungsfilter BG 38 (22 in Abb. 4), das Interferenzlinienfilter 549 mm (23 in Abb. 4) zur Ausfilterung des Erregerlichtes (beide Schott und Gen., Mainz), die Leuchtfeldblende (25 in Abb. 4), die Streulichtblende (26 in Abb. 4) des Fluoreszenz-Illuminators, erreicht den dichromatischen Teilerspiegel mit der Kantenwellenlänge 580 mm, was der Position 4 am Fluoreszenz-Illuminator entspricht (Abb. 6 u. 7) und wird von dort durch das Objektiv (7 in Abb. 4) auf das FEULGEN-gefärbte Chromosom (6 in Abb. 4) reflektiert.

Der verwendete Fluoreszenz-Illuminator (2, 13, 21, 22) ist mit 4 dichromatischen Teilerspiegeln ausgerüstet (Abb. 6 u. 7). Diese Spiegel reflektieren ungefähr 90 % des Lichts bis zu einer definierten Kantenwellenlänge und haben darüber eine hohe Durchlässigkeit von ungefähr 90 %. Die vom Teilerspiegel nicht reflektierte und durch ihn hindurchgehende Anregunsstrahlung wird von einer Lichtfalle absorbiert. Jeder dieser Spiegel hat ein eingebautes, zugeordnetes Sperrfilter, dessen Durchlässigkeit jeweils dort beginnt, wo die Reflektionsfähigkeit des Spiegels aufhört. Diese Teilerspiegel-Sperrfilter Kombination läßt 90 % der Fluoreszenz durch und bietet damit gegenüber dem herkömmlichen

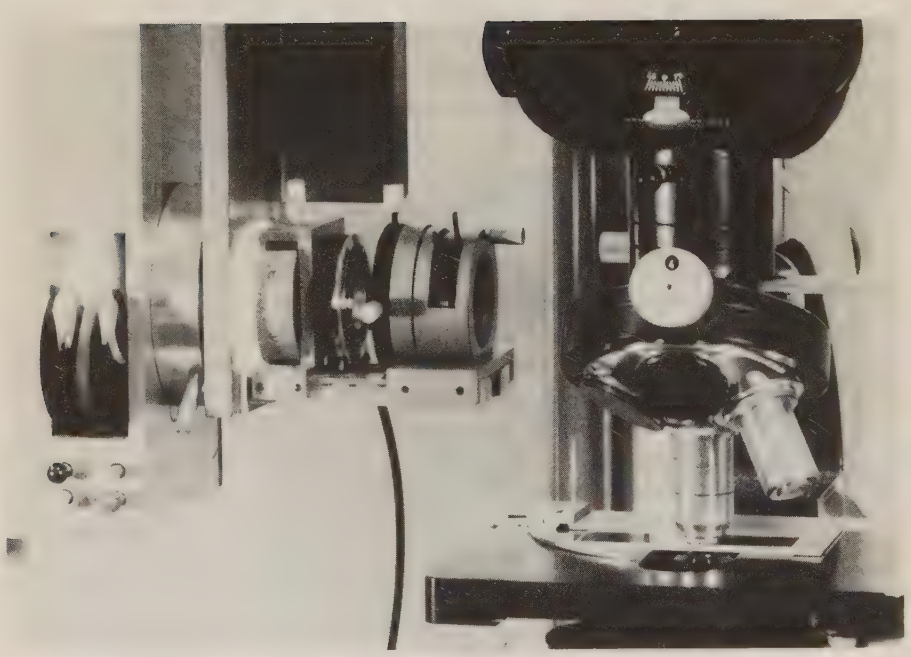


Abb. 6 Teilansicht des MPV mit :

20 Lampenhaus mit Xenonlampe
21 Wärmeschutzfilter
22 Rot-Dämpfungsfilter BG 38
23 Interferenzlinienfilter
24 Compur-Photoverschluß
25 zentrierbarer Blendenhalter mit drehbarer Leuchtfeldblende
8 Fluoreszenz-Illuminator (links Eintrittsöffnung für das Anregungslicht, vorne Schaltrad zur Wahl des Teilerspiegels)
6 Objekt

(Nummerierung wie im Strahlengang auf Seite 12)

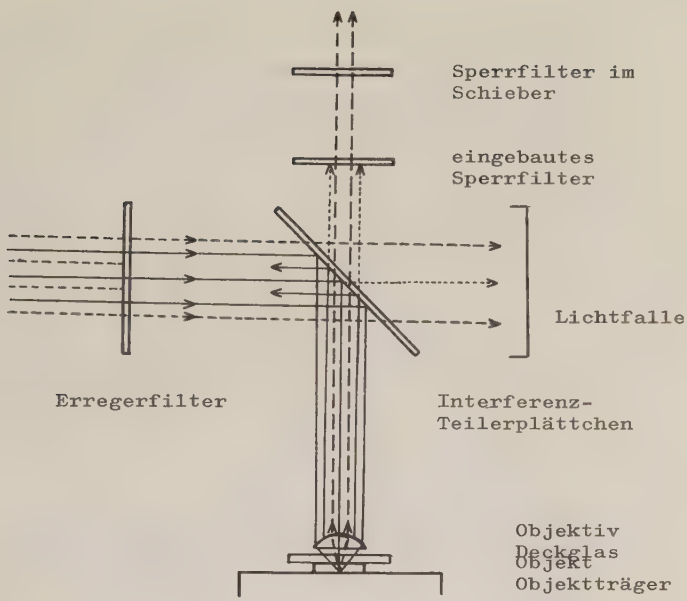


Abb. 7 Schematische Darstellung des Strahlenganges im Fluoreszenz-Illuminator bei Spiegelstellung 4 mit dem grün-reflektierenden Interferenz-Teilerplättchen (nach PLOEM, 1969).

durchgezogene Linie	:	Anregungslicht
waagerecht gestrichelt	:	absorbiertes Licht
senkrecht grobgestr.Linie	:	Fluoreszenzlicht
senkrecht feingestr.Linie	:	im Sperrfilter zurückgehaltenes Licht

Opakilluminator (10) eine Steigerung der Fluoreszenzintensität etwa um den Faktor 4. Außerdem wird das anregende und das emittierte Licht (die Fluoreszenz) streng getrennt. Daraus resultiert der für die Mikrofluorometrie entscheidend wichtige dunkle Untergrund im Präparat.

Die Xenon-Lampe wird über einen magnetischen Spannungskonstanthalter (SIEMENS, Berlin) 4 in Abb. 3) betrieben. Um das Chromosom bei jeder Lage im Präparat beleuchtungsseitig exakt ausblenden zu können, kann die Leuchtfeldblende in ihrer Halterung in einer zur optischen Achse senkrecht stehenden Ebene gedreht werden. Die Streulichtblende (27 in Abb. 4) wird dabei ganz geschlossen gehalten.

6.3 Weg des Fluoreszenzlichtes

Das vom Paraosanilin-gefärbten Chromosom (6 in Abb. 4) emittierte rote Fluoreszenz-Licht passiert das Objektiv (7 in Abb. 4), wird voll von dem dichromatischen Spiegel (8 in Abb. 4) durchgelassen, geht durch das eingebaute Sperrfilter K 580 (8 in Abb. 4), und trifft dann auf das zweite Sperrfilter RG 665 (9 in Abb. 4). Von dem gesamten Fluoreszenzspektrum wird hierbei der Anteil von 580 bis 665 nm zurückgehalten(Abb. 8). Das restliche Licht tritt durch das Teilerplättchen (18 in Abb. 4 u. 8) wobei 50 % durchgelassen werden und 50 % zum Photometereinblick gehen, passiert die Meßblende (17 in Abb. 4 u. 8) und erreicht schließlich den rotempfindlichen Photovervielfacher (27 in Abb. 4) (Typ 9558 A, S-20 Kathode, EMI, England); seine Saugspannung bezieht er aus dem hochstabilisierten Netzgerät NSHM BN 600 (6 in Abb. 2) (Knott, Elektronik, Hohenschäftlarn).

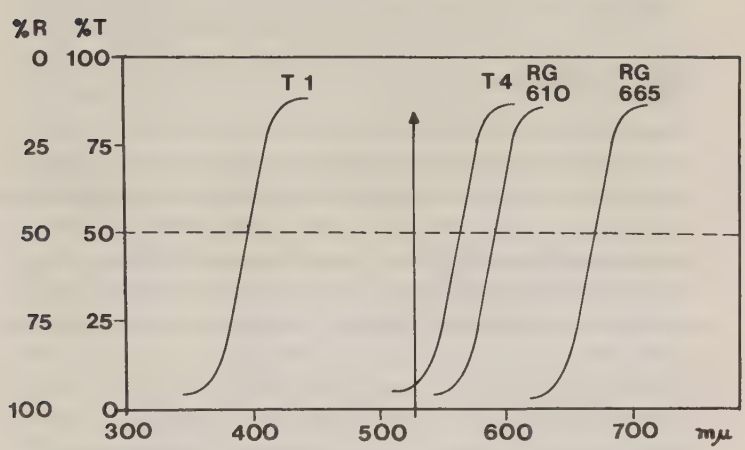


Abb. 8 Lage der Kantenwellenlänge der Teilerspiegel (T1, T4) und der Sperrfilter (RG 610, RG 665) im Spektrum, aufgetragen gegen die Reflexion (% R) und die Durchlässigkeit (% T).
Die Reflexionsfähigkeit der Spiegel beginnt im Kurzwelligen und endet bei der Kantenwellenlänge. Das Licht ab dieser Wellenlänge wird voll durchgelassen. Die Sperrfilter absorbieren bis zur Kantenwellenlänge und lassen danach das Licht voll durch. Der Pfeil kennzeichnet die Lage der anregenden Wellenlänge im Spektrum für Pararosanilin.

Die Registrierung der Messung des Photostroms erfolgt mit dem Potentiometer-Linienschreiber Servogor RE 511 (Metrawatt, Nürnberg), der speziell auf ein Arbeiten mit dem EMI-Photovervielfacher abgestimmt ist (durch Knott Elektronik, Hohenschäftlarn).

6.4 Eichung der Photokathode

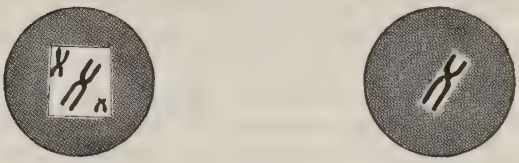
Die natürliche Drift der Photokathode erfordert eine halbstündige Eichung. Durch eine Veränderung der Saugspannung werden die Abweichungen an den jeweiligen Eichwert angeglichen. Die Höhe dieses Eichwertes muß nur während der Messung einer Mitose konstant gehalten werden; zwischen den einzelnen Mitosen kann dieser Wert geändert werden, da ja für die Ergebnisse nur die relativen Werte der Chromosomen entscheidend sind.
Als Fluoreszenzstandard wurde ein 2 mm dickes GG 21 Glas (Schott u. Gen.) (2) verwendet. Es wurde mit einem 5 mm dicken BG 12 Filter in Kombination mit einem 0,2 % durchlässigen Graufilter angeregt, was eine innerhalb des vom Objekt her geforderten Meßbereiches grüne Fluoreszenz ergibt, die mit dem Sperrfilter K 530 ausgefiltert wird.
Zur Eichung wird die Leuchtfeldblende (zentrierbare Irisblende) ganz offen gehalten, was in der Objektebene einem Durchmesser von 30 μ entspricht, ebenso die Meßblende (zentrierbare Irisblende) deren Größe dann in der Objektebene einem Durchmesser von 20 μ entspricht. Bei dieser Blendenanordnung und einer Saugspannung von 1,1 KV bei einer Eingangsempfindlichkeit des Schreibers von 50 mV lagen die gemessenen Eichwerte bei 30 %. Dieser Wert schwankte bei halbstündlicher Eichung während einer Meßdauer von 6 - 8 Stunden für alle 46 Chromosomen maximal $\pm$ 5 %.

6.5 Einstellung der Blenden und Meßvorgang

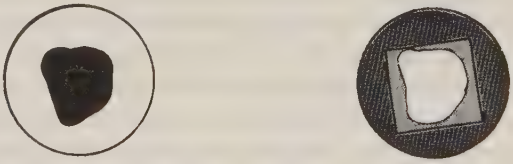
Die Größe der Meßfeldblende wird zuerst im Phasenkontrast an das zu messende Chromosom angepaßt (Abb. 5). Dann wird ein Zellkern, der genügend weit von der Mitose entfernt ist (d.h. soweit, daß zumindest kein Teil der zu messenden Mitose mehr im Blickfeld ist) in das Feld gefahren und zur Fluoreszenz angeregt. Blickt man nun wieder in den Photometereinblick, so kann man die Leuchtfeldblende exakt an die Meßblende und damit auch an die Größe des Chromosoms anpassen. Nach Schließen des Compur-Verschlusses wird dasselbe Chromosom erneut im Phasenkontrast in das Meßfeld eingestellt und fokussiert. Jetzt wird die Phasenkontrast- und die Meßfeldbeleuchtung abgeschaltet und der Weg für das Anregungslicht und das Fluoreszenzlicht durch Einklappen der entsprechenden, unter 6.2 und 6.3 genannten Filter und Spiegel vorbereitet. Durch kurzzeitiges (ca. 1 sec) Öffnen des mit einem Drahtauslöser gekoppelten Photoverschlusses wird das Chromosom nun zur Fluoreszenz angeregt und gemessen.

Um die Leuchtfeld- und Meßblende in Form und Größe dem zu messenden Chromosom so gut wie möglich anpassen zu können, wurde an den kleinen Chromosomen mit der Irisblende, an den großen mit der Vierkantblende gearbeitet, dabei wurde die Leuchtfeldblende seitlich immer um ca. 1 µ weiter geöffnet als die Meßblende. Es wurden nur solche Mitosen gemessen, bei denen möglichst alle Chromosomen gestreckt waren und somit die Blenden gut angepasst werden konnten. Die Größe der dabei verwendeten Blendenöffnungen lag dabei zwischen 14 x 5 µ für die Chromosomen der Gruppe A und 3 µ für die der Gruppe G. Bei den Blenden der benutzten Größenordnung konnte keine meßbare Untergrundfluoreszenz festgestellt werden

Abb. 9 Schematische Erläuterung zum Problem der Anpassung der Blenden an das Chromosom



1.Schritt :Angleichen der Meßblende an das Chromosom im Phasenkontrast



2.Schritt: Einstellen eines geeigneten Zellkerns im Phasenkontrast und Anregung zur Fluoreszenz mit Einblendung der nicht eingestellten Leuchtfeldblende

3.Schritt: Anpassung der Leuchtfeldblende an die eingestellte Meßfeldblende im Photometereinblick

4.Schritt: Erneutes Einstellen des Chromosoms im Phasenkontrast in die Meßfeldblende.
Öffnen des Fluoreszenzlichtweges und Messung des Chromosoms.

und selbst für die größte Öffnung der zentrierten Irisblenden (20 µ) lagen die gemessenen Untergrundswerte nur bei maximal 2 %.

Wenn es die Lage des Chromosoms zuließ, dann wurde zur Feststellung der Untergrundfluoreszenz nach der Messung des Chromosoms mit derselben Blendenöffnung der Untergrund neben dem Chromosom gemessen, ohne natürlich den Teil eines anderen fluoreszierenden Partikels im Bild zu haben. Diese Messungen ergaben fast immer 0, d.h. es war keine Emission meßbar und somit konnte man von der völligen Dunkelheit des Untergrundes ausgehen. Trotzdem hat sich gezeigt, daß man die Blende in Bezug auf das Chromosom nicht beliebig in ihrer Größe verändern darf. Ein und dasselbe Chromosom weist nämlich eine größere Fluoreszenzintensität auf, wenn die angepaßte Meßblende bei unveränderter Leuchtfeldblendengröße weiter geöffnet wird. Dies ist auf Streulichteffekte im Photometer zurückzuführen. Daher mußte der Abstand zwischen Chromosom und Blendenrand mit ca. 1 µ möglichst konstant gehalten werden (Kontrolle durch ein kalibriertes Fadenkreuz im Photometereinblick).

7. Ergebnisse

7.1 Vorversuche

Von den in der Literatur als DNS-spezifischen Fluorochromen wie Auramin OO (29), Acridinorange (2), Acriflavin (2), das Präparat 33 258 "Hoechst" sowie Coriphosphin O (2) und Pararosanilin (21) wurde Pararosanilin als bestgeeignete Substanz zur fluorometrischen DNS-Messung an Chromosomen herausgefunden. Die Vorversuche mit Acriflavin verliefen negativ, weil es nicht gelang einen völlig dunklen Untergrund zu erreichen.
Die hohe Spezifität der zugrundeliegenden FEULGEN-Reaktion für DNS kann als nachgewiesen gelten (6) und beruht auf einer chemischen Bindung, die weder mit Histonen noch mit anderen Chromosomenbestandteilen eingegangen wird (Abb. 10).
Die FEULGEN-Reaktion beruht auf zwei Schritten :

a) einer vollständigen Särehydrolyse der DNS, die alle Purine entfernt und damit die Aldehydfunktion der Desoxyribofuranose-Zucker, an die sie gebunden waren freilegt.
b) Die so entstandenen Aldehyde reagieren dann mit dem entfärbten SCHIFF'schen Reagenz, das damit in seine farblich sichtbare Form (rot bei Pararosanilin) übergeführt wird.

Außer der wichtigen Voraussetzung der Spezifität hat der FEULGEN-Farbstoff Pararosanilin noch verschiedene Vorteile : Seine Herstellung ist standardisiert (9), CARLSON et al. (4) benutzten dieselbe Färbung bei ihren absorbtionscytophotometrischen DNS-Messungen, die Stöchiometrie dieser Färbung ist bis ins einzelne geklärt und erprobt (32) und selbst die Verwendung sehr geringer Farbstoffkonzentrationen ergibt noch ausreichenden Kontrast und eine gute Fluoreszenzintensität.

Nach Vorversuchen mit 0,05 %igem und 0,01 %igem Pararosanilin wurden die Messungen dann an 0,1 % Pararosanilin gefärbten Mitosen durchgeführt, da bei den schwächer gefärbten Präparaten wegen des schwachen Kontrasts ein Einstellen der Chromosomen kaum mehr möglich war.

Bei der Auswahl des geeigneten Einbettungsmediums wurden unter gleichen Bedingungen Präparate mit dickflüssigem und dünnflüssigem Paraffinöl, mit den von den Firmen als nichtfluoreszierend deklarierten Mitteln Cargille-Öl (n=1,556) (Cargille Lab., Cedar Grove, N.Y., USA) und Immersionsöl (E.Leitz, Wetzlar) sowie mit Eukitt (n=1,491) auf ihre Brauchbarkeit in Bezug auf ihre Untergrundfluoreszenz und ihre optischen Eigenschaften im Phasenkontrast untersucht. Das Ergebnis war, daß das herkömmliche Eukitt sich auch bei dieser Methode als sehr brauchbar erwies, da es sowohl keine messbare Untergrundfluoreszenz zeigte als auch das kontrastreichste Bild im Phasenkontrast zeigte.

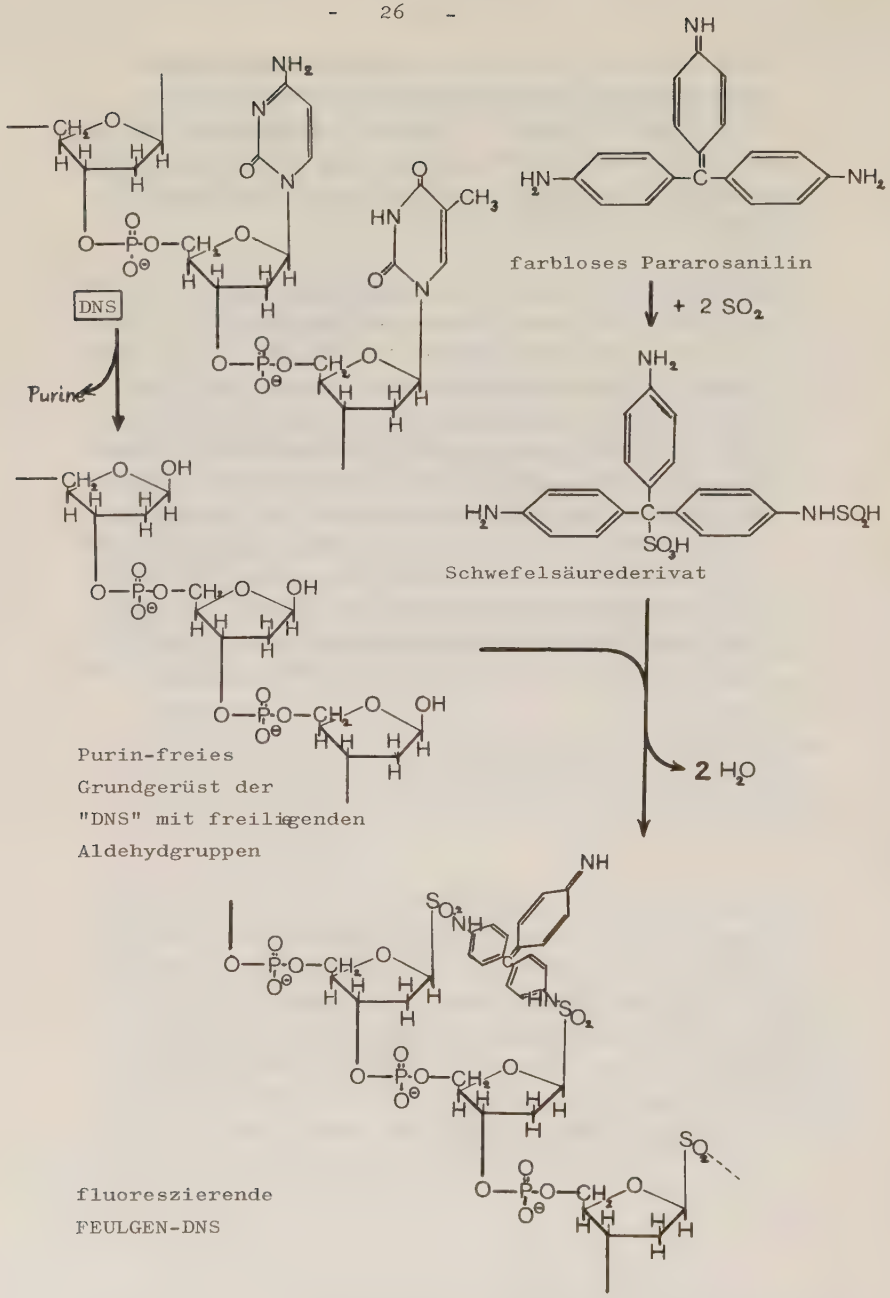


Abb. 10 Die FEULGEN-Reaktion am Beispiel des Pararosanilin

7.2 Abfall der Fluoreszenzintensität

Wie die Abbildung 11 zeigt, ist die Abfallgeschwindigkeit zu Beginn der Anregung am größten und wird dann immer geringer. Diese Kurve entspricht mathematisch einer e-Funktion, was für alle 0,1 % FEULGEN-Pararosanilin gefärbten Chromosomen des menschlichen Karyotyps annähernd gleich zutrifft.
Da der Schreiber für den Vollausschlag nur 1 sec benötigt, andererseits die vom Schreiber aufgezeichnete Kurve im Bereich der kurzen Belichtungszeit einen annähernd linearen Abfall aufweist, kann der Maximalwert rechnerisch leicht ermittelt werden. Der Meßfehler durch Photooxydation dürfte damit auch unter dem präparativen Fehler der FEULGEN-Färbung liegen (2). In Abbildung 13 sind die an je fünf verschieden großen Chromosomen gemessenen Fluoreszenzintensitäten in Form der vom Schreiber registrierten Kurven nebeneinander aufgezeichnet.

7.3 Verhältnis zwischen Fluoreszenzintensität und Farbstoffkonzentration

Für die Bestimmung der DNS mit der beschriebenen Methode ist die Proportionalität zwischen DNS-Gehalt der Chromosomen und der Intensität des Fluoreszenzlichtes eine wichtige Voraussetzung (19, 26, 27). Nach BÖHM und SPRENGER (2) besteht eine lineare Beziehung zwischen Fluoreszenzintensität und Konzentration nur bis zu einem Wert von 0,2 Extinktionseinheiten, also nur bei kleinen Farbstoffkonzentrationen (Abb. 12). Mit Hilfe eines Absorbtionsspektrographen (Leitz, Wetzlar) wurde die Extinktion der 0,1 % FEULGEN-Pararosanilin gefärbten chromosomalen DNS bestimmt; sie lag bei Extinktionswerten um 1,2 ($\pm$ 0,2) und liegt damit eindeutig im linearen Bereich. Für die 0,05 %ige und die 0,01 %ige Färbung liegen die Werte unter

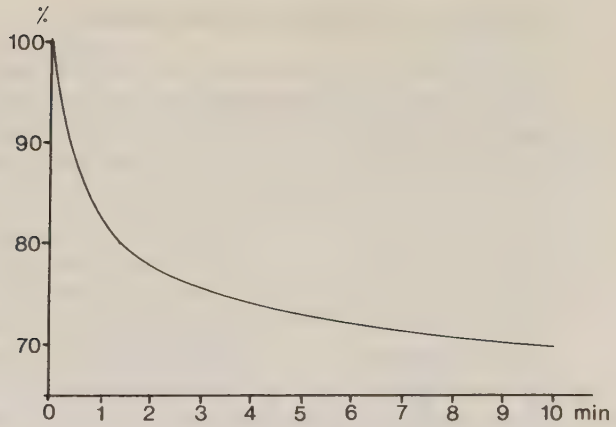


Abb. 11 Fluoreszenzabfallkurve eines 0,1 % FEULGEN-Pararosanilin-gefärbten Chromosoms A 1 eines männlichen Karyotyps, angeregt mit 549 nm.

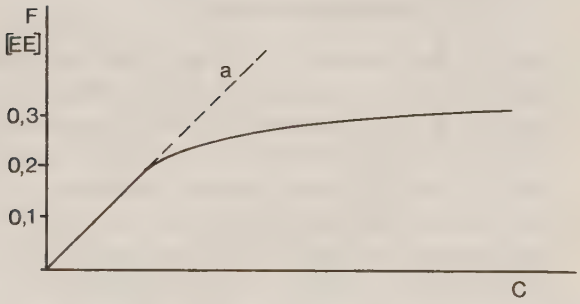


Abb. 12 Fluoreszenzintensität (F) aufgetragen gegen die Konzentration des Fluorochroms (C). Ein lineares Verhältnis (a) ist nur bei niedrigen Konzentrationen gegeben. (nach PERRIN, 1924)

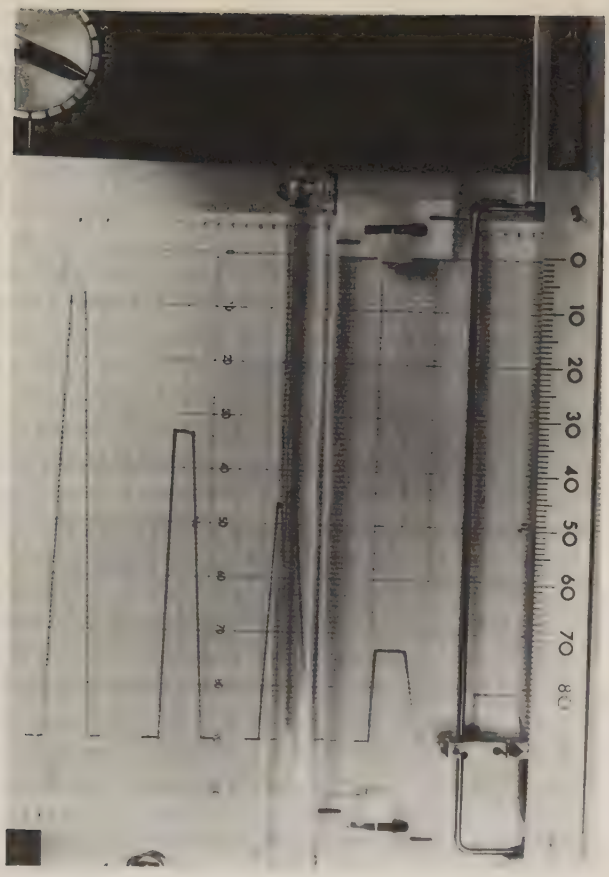


Abb. 13 Meßwerte von 5 verschieden großen Chromosomen, gemessen mit einer Saugspannung von 1,1 KV bei einer Eingangsempfindlichkeit des Schreibers von 50 mV und einer Registriergeschwindigkeit von 600 mm/min. Für einen Vollausschlag (100 %) benötigte der Schreiber 1 sec.

0,1 Extinktionseinheiten.

7.4 Meßergebnisse

Bei jeder Messung lagen Photographien vor, die vorher von der ungefärbten Mitose im Phasenkontrast angefertigt worden waren (Abb. 1 u. 2). Dies ermöglichte die Markierung der Mitose und der gemessenen Chromosomen und dadurch konnte die Doppelmessung homologer Chromosomen sorgfältig ausgeschlossen werden. Außerdem wurde jedes Chromosom nach der Messung daraufhin überprüft, ob es a) vollständig gemessen und ob
b) nicht ein in der Nähe liegendes Chromosom zufällig mitbelichtet worden war.
Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Der Meßwert für jedes Chromosom wurde aus der vom Schreiber aufgezeichneten Kurve (Abb. 13) graphisch ermittelt als der Punkt, in dem sich die Senkrechte, errichtet auf dem Nullpunkt des Schreibers im Moment des Belichtungsbeginnes, mit der Geraden schneidet, die den mittleren Abfall der Kurve repräsentiert. Aus der Summe der Einzelwerte aller Chromosomen einer Mitose, die gleich 100 % gesetzt wurde, ergeben sich die Werte für die einzelnen Chromosomenpaare als prozentualer Anteil der Gesamtmitose. Der Variationskoeffizient der Messungen schwankt zwischen 2,3 und 16 %.

Nachdem der absolute DNS-Gehalt eines menschlichen Zellkerns mit diploiden Chromosomensatz durch Bestimmung mit verschiedenen Methoden (15, 31, 36) heute mit $2{,}7 \times 10^{-12}$ g als gesichert anerkannt wird, kann man daraus in Verbindung mit unseren Ergebnissen den absoluten DNS-Gehalt der einzelnen Chromosomen des menschlichen Karyotyps berechnen (Tabelle 2).

Chromosomen-paare	gemessene Extinktionswerte der Mitosen				Mittelwert in % der Gesamt-emission der Metaphase
	H.P.	N 25/3	Q 26/4	M 15/3	
A 1	83,0/98,0	75,0/72,0	92,5/100	105/96,0	11,30
2	90 /80	62 /51	83 / 77	79/75	9,38
3	71 /60	53 /43,5	80 / 70	70/57	7,90
B 4	88,5/81,5	52 /40	60,5/56,5	61/60	7,23
5	64 /56	49 /37	57 /56	75/40	6,82
C 6	49 /47	36 /34	45,5/43	47/43	5,44
7	46 /45	30 /28	42,5/42,5	36/36	4,81
8	43,5/41	27,5/29	37,5/37,5	40,5/33	4,54
9	40 /40	26,5/25,5	37,5/36,5	36/30	4,26
10	39 /38	24 /24	34 /34	37,5/31,5	4,08
11	38 /28	23 /22	33 /33	38,5/33	3,90
12	25 /20	20,5/20	29,5/29	32 /30	3,26
D 13	36,5/39,5	23 /18	29,5/24	27,5/24	3,47
14	33 /30	17,5/17,5	23 /21,5	25 /25	3,00
15	26 / 20	17,5/17	19,5/16	30 /22,5	2,66
E 16	24 /22	15 /10	19,5/14,5	21 /21	2,28
17	22 /20	16 /15	33 /20,5	17,5/17	2,37
18	19 /16	14,5/14	20 /16	19,5/19	2,18
F 19	18 /15	12 /11	20 /13,5	18 /12	1,87
20	13 /11	9 / 8	13 /12	14,5/ 9,5	1,41
G 21	15 /13,5	9 / 9	16 /11	12,5/12,5	1,53
22	13 /12	7 / 7	9,5/ 9	14 / 8,5	1,24
X	52	37	67,5	42,5	3,11
Y	25	32	19	10	1,42

Tabelle 1 Ergebnisse der Fluoreszenz-FEULGEN-DNS Messungen

Chromosomen-paare	Mittelwert in % der Gesamtemission der Metaphase	Standard-abweichung	Variations-koeffizient in %	absoluter DNS-Gehalt in Gramm x 10
A 1	11,30	± 0,96	8,5	30,50
2	9,38	± 0,585	6,2	25,20
3	7,90	± 0,40	5,1	21,30
B 4	7,23	± 0,205	2,8	19,50
5	6,82	± 0,169	2,48	18,40
C 6	5,44	± 0,178	3,26	14,70
7	4,81	± 0,326	6,8	13,00
8	4.54	± 0,104	2,3	12,25
9	4,26	± 0,195	4,56	11,50
10	4,08	± 0,180	4,40	11,02
11	3,90	± 0,36	8,6	10,52
12	3,26	± 0,545	16,4	8,80
D 13	3,47	± 0,521	15,0	9,36
14	3,00	± 0,363	12,1	8,10
15	2,66	± 0,446	16,6	7,18
E 16	2,28	± 0,311	13,2	6,16
17	2,37	± 0,21	8,8	6,40
18	2,18	± 0,182	8,3	5,88
F 19	1,87	± 0,072	3,88	5,05
20	1,41	± 0,072	5,1	3,81
G 21	1,53	± 0,068	4,45	4,12
22	1,24	± 0,148	11,9	3,33
X	3,11			8,40
Y	1,42			3,83
Gesamtmitose	100,00 %			$270,00 \times 10^{-14}$ g

Tabelle 2 : Relative DNS-Werte mit Standardabweichung und Variationskoeffizient sowie den daraus berechneten absoluten DNS-Mengen der einzelnen Chromosomen.

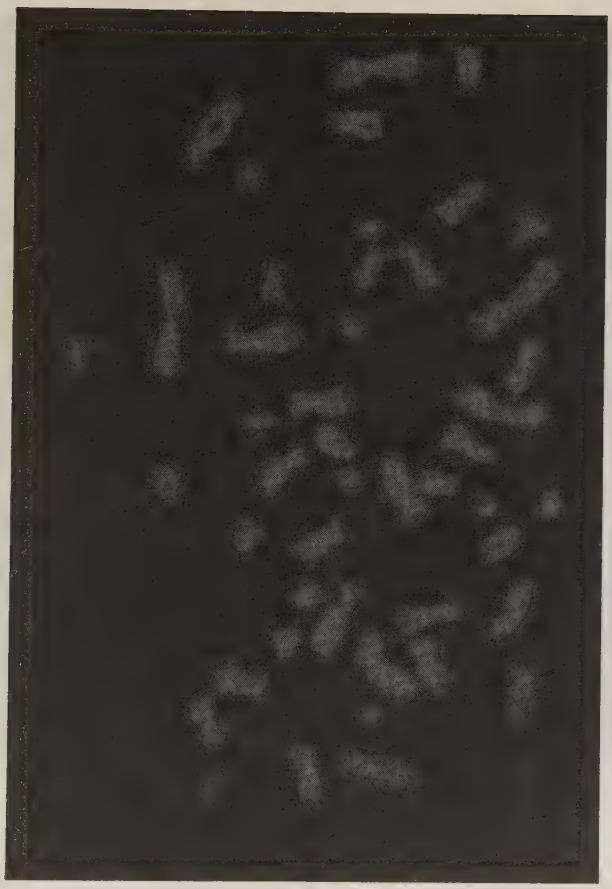


Abb. 14 Fluoreszierende Metaphaseplatte eines Mannes (gefärbt mit Pararosanilin)

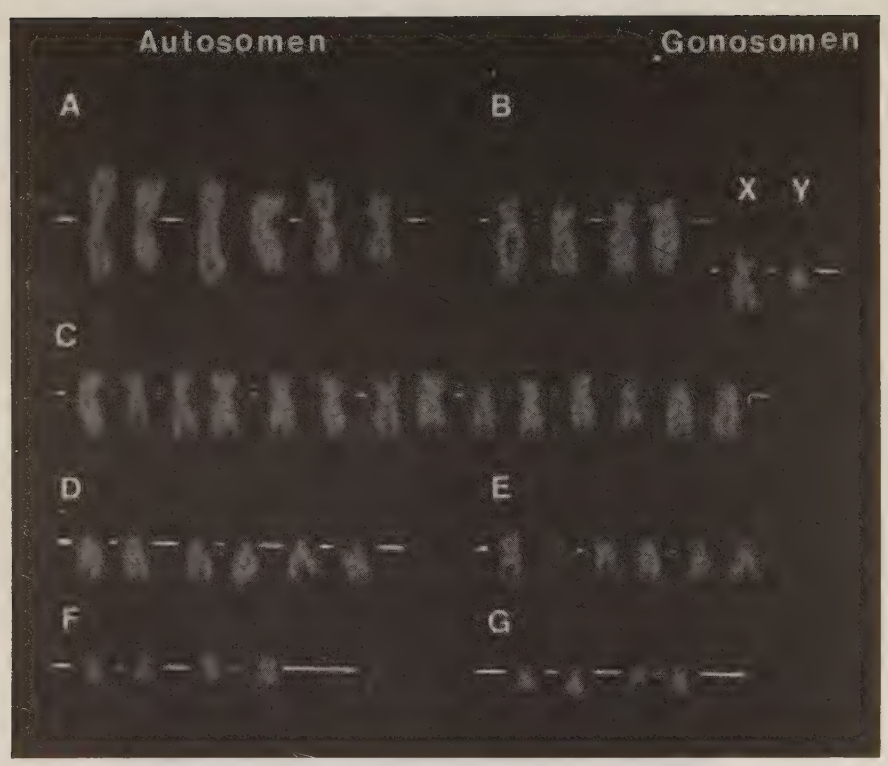


Abb. 15 Karyotyp eines männlichen Probanden aus der Mitoseplatte in Abb. 14

IV. DISKUSSION

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen ebenso wie die Messungen von BOSSHARD (3), RIGLER (23) und BÖHM und SPRENGER (2), daß fluorometrische DNS-Messungen verläßliche und reproduzierbare Werte liefern. Trotzdem ist verständlich, daß eine Methode wie die Fluoreszenz-Cytophotometrie, die von so vielen technischen und präparativen Faktoren abhängig ist, einige Probleme mit sich bringt.

1. Das Problem der relativen Fehlerhaftigkeit fluorometrischer Messungen

ROSANOV und KUDRYAVTSEV (25) glauben die relative Fehlerhaftigkeit fluorometrischer Messungen in Abhängigkeit von der optischen Dichte aus folgender Formel und der daraus resultierenden Kurve (Abb. 14) berechnen zu können.

$$\frac{Q}{Q} = -\left(1 - \frac{1-e^{-A}}{A}\right) \cdot 100\ \%$$

(Q:zu bestimmende Substanz, A : optische Dichte)

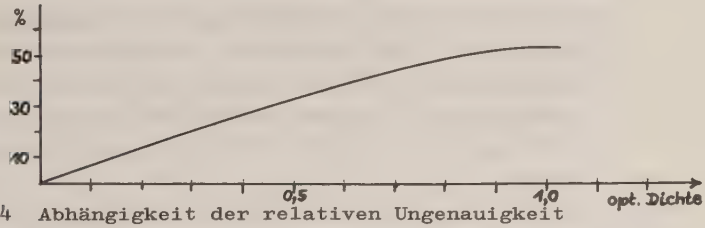


Abb. 14 Abhängigkeit der relativen Ungenauigkeit fluorometrischer Messungen von der optischen Dichte des untersuchten Objektes (nach ROSANOV und KUDRYAVTSEV, 1967).

Für Teile der Untersuchungen von BÖHM und SPRENGER (2) ergäbe sich daraus eine Ungenauigkeit von ca. 18 % wogegen allerdings die gute Korrelation mit absorptionsphotometrischen Vergleichsmessungen spricht. Für unsere eigenen Ergebnisse berechneten wir nach dieser Formel nur eine Ungenauigkeit von 3 %.

2. Präparative Schwierigkeiten und Fehler

Alle cytophotometrischen Untersuchungen an Chromosomen sind durch präparative Schwierigkeiten und Fehlermöglichkeiten belastet :

a) Zur Gewinnung des für die Cytophotometrie so entscheidend wichtigen schwarzen, d.h. von Cytoplasmaresten freien Untergrundes ist eine sorgfältige Behandlung erforderlich.
Außerdem ist die Bereitung gut ausgebreiteten Mitosen unbedingt erforderlich.

b) Der Verlust von DNS während der Fixierung (Methanol-Eisessig) (7), durch die Eisessigeinwirkung, hypotoner Behandlung (28) und Hydrolyse bei der FEULGEN-Färbung (7).

Bei der Fixation der Chromosomen mit einem Formaldehyd-Methanol-Gemisch im Verhältnis 1 : 9 anstelle der üblichen Methanol-Eisessig Behandlung stellten GAILLARD et al. (7) höhere absolute DNS-Werte fest. Da man aus diesen Messungen schließen muß, daß bei der Eisessig-Fixation DNS verloren geht, benutzten wir das Formaldehyd-Methanol-Gemisch.

In der Frage der Auswirkungen einer hypotonen Behandlung bei der Chromosomenpräparation auf den DNS-Gehalt gehen die Meinungen weit auseinander. Während RUDKIN et al. (29) aus einem niederen Wert A_T, der Gesamtabsorption eines Chromosoms bei besonders stark hypoton behandelten Präparaten auf einen DNS-Verlust durch diese Behandlung schließen, fand GARCIA (8) eine 7 - 12 %ige Erhöhung des DNS-Gehaltes von Kaninchen-Leukocyten nach hypotoner

Behandlung. Durch die von BAILLY (1) und CASPERSSON (4) angegebene Squash-Präparation kann die hypotone Behandlung umgangen werden, aber für cytophotometrische Messungen ist sie vor allem wegen der schlechten Ausbreitung der Chromosomen unbrauchbar.
GAILLARD et al. (7) berichten über die Möglichkeit eines 10 - 20 %igen DNS-Verlustes durch die FEULGEN-Hydrolyse, der allerdings durch die vergleichenden FEULGEN- und UV-Absorptionsmessungen von BAILLY (1) nicht bestätigt werden konnte. Da sich ein solcher Verlust statistisch auf alle Chromosomen entsprechend ihrer Größe verteilen müßte, spielt er bei den vorliegenden relativen Werten wahrscheinlich keine ausschlaggebende Rolle.

Eine ungelöste Frage ergibt sich aus den Unterschieden im DNS-Gehalt zwischen homologen Chromosomen innerhalb einer Zelle und auch zwischen entsprechenden Chromosomen verschiedener Zellen. Die Ursache für diese von allen Autoren einstimmig gefundenen Differenzen sind völlig unklar. Man kann nur Vermutungen darüber anstellen, ob sie durch präparative Fehler oder fehlende Stöchiometrie der Farbbindung bedingt sind, oder ob der DNS-Gehalt homologer Chromosomen wirklich von Zelle zu Zelle bzw. innerhalb einer Zelle verschieden ist.
Trotz all dieser Fragen ist die FEULGEN-Reaktion durch Standardisierung der Bedingungen von Präparation, Fixierung, Hydrolyse und Färbung quantitativ sehr zuverlässig (30).

3. Reabsorption

Reabsorptionsphänomene (2) ("autoabsorption" nach 37) spielen bei unseren Untersuchungen keine Rolle, da der verwendete Sperrfilter RG 665 außerhalb des spektralen Absorptionsbereiches des Pararosanilin liegt.

4. Kritische Prüfung der Ergebnisse

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse anderer Autoren bei Messungen am Chromosom im Vergleich gesetzt zu den eigenen Werten. Dabei ist die Verschiedenheit der Methoden zu berücksichtigen. Während PFEIFFER (10) (Spalte 3) Längenmessungen an Chromosomen durchführte bei denen er einen Variationskoeffizienten zwischen 9,2 und 19,8 % feststellte, bestimmte LAMPERT (14) (Spalte 4) die Chromosomen-Trockengewichte und hatte dabei eine Varianz von 12 bis 33,2 %.
Nur die Ergebnisse von RUDKIN (29) (Spalte 2) lassen sich eigentlich mit den eigenen Werten (Spalte 1) vergleichen, da nur er auch speziell die DNS gemessen hat. Bei diesen Absorptions-DNS-Messungen schwankte der Variationskoeffizient zwischen 6,5 und 17,7 %.
Die bei den hier vorliegenden Ergenissen berechnete Varianz liegt zwischen 2,3 und 16,6 %, was zeigt, daß fluorometrische DNS-Messungen verläßliche und reproduzierbare Werte liefert.
Die auffallende Erscheinung, daß in unseren Messungen die großen Chromosomen größer und die Kleinen kleiner zu sein scheinen als bei den anderen Autoren konnte nicht erklärt werden.

In der Zukunft wird die mikrofluorometrische Messung an Chromosomen noch erheblich an Bedeutung gewinnen seit CASPERSSON et al. (5) zeigen konnten, daß man durch Fluoreszenzfarbstoffe, die spezifisch an bestimmte DNS-Strukturen gebunden werden, wie zum Beispiel Quinacrin-Mustrad an guaninreiche Teile des DNS-Stranges verschiedene Muster auf den einzelnen Chromosomen sichtbar machen kann und damit einerseits die Chromosomen eindeutig identifizieren kann und andererseits Materialverluste oder Zunahme auch kleineren Ausmaßes feststellen kann.

Chromosom	eigene Ergebnisse	RUDKIN (1965)	PFEIFFER (1968)	LAMPERT (1969)
	Fluoreszenz-cytophotometr. Messung	Absorptions-messung	Längen-messung	Chromosomen-trockengewicht-bestimmung
A 1	11,3	8,38	8,15	9,81
2	9,38	7,47	7,64	7,43
3	7,90	6,63	6,73	6,76
B 4 - 5	7,02	5,80	6,05	4,50
C 6-X-12	4,18	4,89	4,76	4,86
D 13-15	3,04	3,57	3,38	3,74
E 16	2,28	2,78	3,14	3,95
E 17-18	2,27	2,88	2,85	2,74
F 19-20	1,64	2,23	2,38	2,14
G 21-22	1,38	1,64	1,77	1,54
Y	1,42			

Tabelle 3 Vergleichende Zusammenstellung der Ergebnisse von Chromosomen-Messungen verschiedener Autoren mit verschiedenen Methoden.

Um die Ergebnisse der eigenen Messungen mit denen der anderen Autoren vergleichbar zu machen, wurden sie ebenso gruppiert.

Alle Werte sind Angaben für ein homologes Chromosomenpaar der entsprechenden Gruppe in Prozent, bezogen auf die gesamte Metaphase.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Da bis heute keine quantitativen, fluorometrischen DNS-Messungen an menschlichen Chromosomen durchgeführt wurden und andererseits die Ergebnisse fluoreszenzcytophotometrischer Messungen der DNS von Zellkernen eine sehr genaue und erprobte Methode darstellen, lag es nahe diese Methode auch auf menschliche Chromosomen zu übertragen. Die vorliegende Arbeit berichtet über die Messungen und deren Ergebnisse bei der Bestimmung des DNS-Gehaltes individueller menschlicher Chromosomen am Karyotyp des Mannes mit Hilfe eines mikrofluorometrischen Verfahrens. Zur Messung wird das MPV (Mikroskop-Photometer mit variabler Meßblende, E.Leitz, Wetzlar) benutzt, das mit einer Vorrichtung für gleichzeitige und sukzessive Durchlicht-Phasenkontrastbeobachtung und Auflicht-Fluoreszenzanregung ausgestattet ist. Außerdem ist das Gerät mit dem Auflicht-Fluoreszenz-Illuminator nach PLOEM (E.Leitz,Wetzlar) ausgerüstet, der gegenüber herkömmlichen Opak-Illuminatoren eine Steigerung der Fluoreszenzintensität um den Faktor 4 bewirkt.
Die Messungen wurden an den aus Leukocytenkulturen gewonnenen Mitosen männlicher, unausgewählter Probanden durchgeführt.

Die Chromosomen wurden mit der herkömmlichen FEULGEN-Färbung gefärbt, die man seit 1924 als spezifische Nukleinsäurereaktionkennt, von der man aber erst seit 1967 weiß, daß sie nach Anregung mit grünem Licht (549 nm) im Auflicht eine strake rote Fluoreszenz ergibt.
Die Probleme des Fluoreszenzabfalles und der Linearität zwischen Farbstoffkonzentration und Fluoreszenzintensität konnten durch die Wahl der Farbstoffkonzentration, 0,1 % Pararosanilin, befriedigend gelöst werden. Nach

einer Hydrolyse von 105 min bei 28°C in 4 n-HCl wurden die Chromosomen 60 min lang in 0,1 %igem Pararosanilin gefärbt.
Der Variationskoeffizient der Messungen schwankt zwischen 2,3 und 16,6 %, die Werte sind also gut reproduzierbar und die Ergebnisse korrelieren befriedigend mit den aus der Literatur bekannten absorptionscytophotometrischen DNS-Messungen, Längenbestimmungen und Chromosomentrockengewichtsbestimmungen die eine Varianz zwischen 6,5 % und 33,2 % aufweisen.
Die mikrofluorometrische Bestimmung des FEULGEN-DNS-Gehaltes menschlicher Chromosomen besitzt gegenüber anderen Methoden außer der größeren Genauigkeit den Vorteil, daß sie wesentlich billiger und zeitsparender anzuwenden ist. Sie eröffnet damit eine Möglichkeit zur Bestimmung des DNS-Gehaltes von menschlichen Chromosomen. Zu ihrer Identifizierung innerhalb des Karyotyps ist sie dagegen nur bedingt anwendbar, vor allem seit in neuester Zeit die Quinacrin-Fluoreszenz und die differenzierte Giemsa-Technik entwickelt wurden.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1. BAILLY,S. : Étude cytophotométrique de la teneur acides nucléiques des chromosomes métaphasiques de l'amphibien urodéle PLEURODELES WALTLII MICHAH.
Exper.Cell Res. 48, 549 - 556 (1967)

2. BÖHM,N. and E.SPRENGER :
Fluorescence cytophotometry : a valuable method for the quantitative determination of nuclear FEULGEN-DNS.
Histochemie 16, 100 - 118 (1968)

3. BOSSHARD,U. : Fluoreszenzmikroskopische Messung des DNS-Gehaltes von Zellkernen.
Z.wiss.Mikroskopie 65, 391 - 408 (1964)

4. CASPERSSON,T., CARLSON,L., G.E.FOLEY, J.KUDYNOWSKI, G.LOMMAKKA, E.SIMMONSSON, L.SÖREN :
The application of quantitative cytochemical techniques to the study of individual mammalien chromosomes.
Exper.Cell.Res. 31, 589 - 594 (1963)

5. CASPERSSON,T., LOMAKKA,G., A.MØLLER :
Computerized chromosome identification by aid of the quinacrine mustard fluorescence technique.
Hereditas 67, 103 (1971)

6. DEICHT,A.D. : Cytophotometrie of Nucleic Acids.
In : Introduction to quantitative cytochemistrie. (WIED,G.L., editor) 327 - 355, New York and London, Academic press (1966)

7. GAILLARD,J.L.J., P.VAN DUIJN and A.SCHABERG :
Photometric determination of DNA in human chromosomes.
Exper.Cell.Res. 53, 417 - 431 (1968)

8. GARCIA,A.M. : Studies on deoxyribonucleic acid in leukocytes and related cells of mammals. VI. The FEULGEN-deoxyribonucleic acid content of rabbit lukocytes after hypotonic treatment.

J.histochem.cytochem. 17, 47 - 55 (1968)

9. GRAUMANN,W. : Zur Standardisierung des SCHIFF'schen Reagens.

Z.wiss.Mikr. 61, 225 - 226 (1953)

10. GREHN,J. und H.KRONMANN :

Kontrastfluoreszenz mit Opak-Illuminator.

Leitz-Mitt.Wiss.Technik 3, 108 - 111 (1965)

11. GREPL,D. : Fluoreszenz-cytophotometrische Messung des FEULGEN-DNS-Gehaltes individueller Chromosomen des weiblichen Karyotyps beim Menschen.

Dissertation, Uni.München (1972)

12. HERZOG,A. und H.-R.SCHÜTZE :

Fluorochromierung von Säugetierchromosomen mit einem basissubstituierten BISBENZIMIDAZOL-Derivat.

Dtsch.Tierärztl.Wschr. 19, 476 - 479 (1968)

13. KRAFT,W. : Die Technologie des Leitz-Fluoreszenzopak.

Leitz-Mitt.Wiss. und Techn. 4, 239 - 242 (1969)

14. LAMPERT,F. : Feinstruktur und Trockengewicht menschlicher Chromosomen.

Quant.Elekt.Mikr. Naturwissenschaften 56, 629 - 633 (1969)

15. LEUCHTENBERGER et al. :

DNA content in spermatozoa of fertile and infertile human males.

Chromosoma 6, 61 - 78 (1953)

16. MENDELSOHN,M.L., T.J.CONWAY, D.A.HUNBERFORD, W.A.KOLMAN, B.H.PERRY and J.M.S.PREWITT :

Computer oriented analysis of human chromosomes.

I.Photometric extimation of DNA-content.

Cytogenetics 5, 223 - 242 (1964)

17. NITSCH,B. und J.-D.MURKEN :

Probleme der Charakterisierung einzelner Chromosomen durch DNS-Messungen.

Humangenetik 9, 16 - 19 (1970)

18. NITSCH,B., J.-D.MURKEN and H.-J.BRÜCK :

Determining FEULGEN-DNA of individual chromosomes by fluorescence cytophotometry with Incident light.

Histochem. 23, 254 - 265 (1970)

19. PERRIN,F. : Loi de décroissance du pouvoir fluorescent de la concentration.

Compt.rend.sci.Paris 178, 1978 - 1980 (1924)

20. PFEIFFER,R.A. : Karyotyp und Phänotyp der autosomalen Chromosomenaberrationen beim Menschen

Fischer, Stuttgart (1968)

21. PLOEM,J.S. : The use of a vertical illuminator with interchangeable dichroic mirrors for fluorescence microscopy with incident light

Z.wiss.Mikroskopie 68, 129 - 142 (1967)

22. PLOEM,J.S. : Ein neuer Illuminatortyp für die Auflicht-Fluoreszenzmikroskopie

Leitz-Mitt.Wiss.u.Technik 4, 225 - 238 (1969)

23. RADLEY,J.M. : DNA-content of individual chromosomes of PROTEMNODON BICOLOR.

Exper.Cell.Res. 41, 217 - 220 (1965)

24. RIGLER,R. : Microfluorometric characterization of intracellular nucleics and nucleoproteine by acridin orange.

Acta physiol.scand. 67, Suppl. 267, 1 - 122 (1966)

25. ROZANOV,J.M. und B.N.KUDRYAVTSEV :

A method of fluorescent cytophotometry for the purposes of a quantitative determination of DNA.(russisch)

Citologija 9, 361 - 367 (1967)

26. RUCH,F. : Determination of DNA content by microfluorometry.

In : Introduction to quantitative cytochemistry. (G.WIED, editor), 281 - 294

New York and London : Academic Press (1966)

27. RUCH,F. und U.BOSSHARD :

Photometrische Bestimmung von Stoffmengen im Fluoreszenzmikroskop.

Z.wiss.Mikr. 65, 335 - 341 (1963)

28. RUDKIN,G.T., D.A.HUNGERFORD and P.C.NOWELL :

DNA content of chromosome Ph and chromosome 21 in human chronic granulocytic leukemia.

Science 144, 1229 - 1232 (1964)

29. RUDKIN,G.T. : Photometric measurements of individual metaphase chromosomes.

In vitro 1, 12 - 20 (1965)

30. SANDRITTER,W., M.CARL and W.RITTER :

Cytophotometric measurements of DNA content of human malignant tumors by means of the FEULGEN-reaction.

Acta cytol.(philad.) 10, 26 - 30 (1966)

31. SANDRITTER,W. et al. :

UV-Mikroskopphotometrische Messung des Nukleinsäuregehaltes von Spermien und diploiden Zellen.

Acta Histochem. 10, 139 - 154 (1960)

32. SANDRITTER,W. : Methods and Results in Quantitative Cytochemistry.

In : Introduction to quantitative cytochemistry. (G.L.WIED, editor) 159 - 182, New York and London : Academic Press (1966)

33. THAER,A.A. : Instrumentation for microfluorometry.

In : Introduction to quantitative cytochemistry (G.L.WIED, editor) 409 - 426, New York and London : Academic Press (1966)

34. VAN DUIJN,P. and J.-P.PERSIJN :

A new technique for studying the quantitative aspects of cytochemical reactions and its application to the FEULGEN-reaction.

Nature 186, 805 - 806 (1960)

35. WEBER,K. : Leitz-Mikroskopphotometer MPV mit variabler Meßblende.

Leitz-Mitt.Wiss.Technik, 3, 137 - 139 (1964)

36. WHITE,D. : The Chromosomes.

Wiley and Sons inc. New York (1961)

37. ZANOTTI,L. : Autoassorbimento ed effetto filtro in fluorimetria.

Acta histochem. (Jena) 17, 353 - 370 (1964)

38. ZERNIKE,F. : Phasecontrast, a new method for microscopic observation of transparent objects.

Physika 9, 686 - 974 (1942)

Dem Leiter des genetischen Labors der Kinderpoliklinik, Herrn Privatdozent Dr. J.-D. MURKEN danke ich für die freundliche Überlassung des Themas, für viele nützliche Ratschläge und die Diskussion der Ergebnisse, sowie die Korrektur der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H. SPIESS danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Dem Direktor des Instituts für Haematologie der Gesellschaft für Strahlenforschung Herrn Prof. Dr. W. STICH sowie den Laborleitern Herrn Dr. BACK und Herrn Priv. Doz. Dr. BAUCHINGER danke ich für die Möglichkeit in ihren Räumen das Mikroskopphotometer zu benützen und meine Messungen durchzuführen.

Herrn Dr. B. NITSCH und Herrn H.-J. BRÜCK gilt mein Dank für die Hilfe bei der Lösung technischer Probleme.

Fräulein R. FRANKENBERGER danke ich besonders für die vielen praktischen Ratschläge und die technische Hilfe bei den Experimenten.

Für die Möglichkeit, die Untersuchungen durchzuführen danke ich der DEUTSCHEN FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT.

LEBENSLAUF

Am 12. 11. 1944 wurde ich, Heinz Reiniger, in Marienbad als einziger Sohn des Architekten Heinz Reiniger und seiner Ehefrau Gerta, geboren.
Nach der Übersiedlung nach Landshut besuchte ich 4 Jahre die Volksschule und wechselte dann in das Hans-Leinberger-Gymnasium in Landshut über, wo ich im Juli 1966 das Abitur ablegte.

Mein Medizinstudium begann ich im Wintersemester 1966/67 an der Universität München. Hier legte ich im April 1968 die Naturwissenschaftliche und im Oktober 1969 die ärztliche Vorprüfung ab.

Auch mein klinisches Studium absolvierte ich an der Universität München.

Von Januar 1970 ab arbeitete ich unter Anleitung von Herrn Priv.Doz.Dr. J.D. Murken an meiner Dissertation im genetischen Labor der Kinderpoliklinik.

Im September 1972 begann ich mit dem medizinischen Staatsexamen.